

Rec'd PCT/PTO 25 JAN 2005

**New cyclic peptides inhibit ligand binding to integrins**

**Patent number:** DE19725368  
**Publication date:** 1998-12-17  
**Inventor:** JONCZYK ALFRED DR [DE]; DIEFENBACH BEATE DR [DE]; SCHWAIGER MARKUS DR [DE]; HAUBNER ROLAND DR [DE]  
**Applicant:** MERCK PATENT GMBH [DE]  
**Classification:**  
- **international:** C07K5/12; C07K1/22; A61K38/08  
- **european:** C07K7/64; C07K9/00F  
**Application number:** DE19971025368 19970616  
**Priority number(s):** DE19971025368 19970616

**Abstract of DE19725368**

Cyclic peptides of formula (I) are new. cyclo(Arg-Gly-Asp-D-E) (I) D, E = optionally derivatised amino acids selected from Gly, Ala, beta -Ala, Asn, Asp, Asp(OA), Arg, Cha, Cys, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Lys(Ac), Lys(AcNH<sub>2</sub>), Lys(AcSH), Lys(R), Met, Nal, Nle, Orn, Phe, Phe(4-OA), Phe(4-Hal), homoPhe, Phg, Pro, Pya, Ser, Thr, Tia, Tic, Trp, Tyr, Tyr(3-I), Tyr(3-F) and Val; A = 1-18C alkyl; Hal = F, Cl, Br or I; Ac = optionally partially fluorinated 1-10C alkanoyl, 7-11C aroyl or 8-12C aralkanoyl; and R = chelator for radioactive isotopes. (I) can be alkylated on the N-atom of the peptide linkage and/or labelled at any position with <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>3</sup>H, <sup>11</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>18</sup>F, <sup>15</sup>O or other radioactive isotopes and chiral amino acids or amino acid derivatives can be in the L or D form.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift  
10 DE 197 25 368 A 1

51 Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 07 K 5/12  
C 07 K 1/22  
A 61 K 38/08

21 Aktenzeichen: 197 25 368.7  
22 Anmeldetag: 16. 6. 97  
43 Offenlegungstag: 17. 12. 98

DE 197 25 368 A 1

71 Anmelder:  
Merck Patent GmbH, 64293 Darmstadt, DE

72 Erfinder:  
Jonczyk, Alfred, Dr., 64295 Darmstadt, DE;  
Diefenbach, Beate, Dr., 64289 Darmstadt, DE;  
Schwaiger, Markus, Dr., 80639 München, DE;  
Haubner, Roland, Dr., 85617 Aßling, DE

54 Cyclische Adhäsionsinhibitoren und deren Verwendung für bildgebende Verfahren  
57 Die Erfindung betrifft neue Cyclopeptide der Formel I

Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-E) I,

worin

D und E jeweils unabhängig voneinander Gly, Ala,  $\beta$ -Ala, Asn, Asp, Asp(OA), Arg, Cha, Cys, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Lys(Ac), Lys(AcNH<sub>2</sub>), Lys(AcSH), Lys(R), Met, Nal, Nle, Orn, Phe, Phe(4-OA), Phe(4-Hal), Homo-Phe, Phg, Pro, Pya, Ser, Thr, Tia, Tic, Trp, Tyr, Tyr(3-I), Tyr(3-F) oder Val, wobei die genannten Aminosäurereste auch derivatisiert sein können,

A Alkyl mit 1-18 C-Atomen,

Hal F, Cl, Br, I,

Ac Alkanoyl mit 1-10 C-Atomen, Aroyl mit 7-11 C-Atomen oder Aralkanoyl mit 8-12 C-Atomen, wobei die Reste auch partiell fluoriert sein können,

R einen Komplexbildner für radioaktive Isotope wie HS(Me)Ac-Gly-Gly-gAbu-OH für Tc-99m oder Tc(O)-bis-(mercaptoacetamido)-pentansäure, Re(O)-Mercaptoethylthioacetyl-Cys, eine Zuckercarbonsäure oder Ac bedeuten, mit der Maßgabe, daß die Verbindungen auch am N-Atom der Peptidbindung alkyliert und/oder an beliebigen Positionen durch 125-I, 123-I, 3-H, 11-C, 14-C, 18-F, 15-O oder andere radioaktive Isotope markiert sein können, und wobei, sofern es sich um Reste optisch aktiver Aminosäuren und Aminosäurederivate handelt, sowohl die D- als auch die L-Formen eingeschlossen sind, sowie deren physiologisch unbedenkliche Salze, innere Salze und Solvate.

Diese Verbindungen eignen sich zur Verwendung und zur Diagnose im Rahmen von bildgebenden Verfahren, insbesondere Tumor-Imaging, wirken als Integrin-Inhibitoren und können insbesondere auch zur Prophylaxe und ...

DE 197 25 368 A 1

Die Erfindung betrifft neue Cyclopeptide und deren Verwendung für bildgebende Verfahren der Formel I

5 Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-E) I,

worin

D und E jeweils unabhängig voneinander Gly, Ala,  $\beta$ -Ala, Asn, Asp, Asp(OA), Arg, Cha, Cys, Gin, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Lys(Ac), Lys(AcNH<sub>2</sub>), Lys(AcSH), Lys(R), Met, Nal, Nle, Orn, Phe, Phe(4-OA) Phe(4-Hal), Homo-Phe, Phg, Pro, Pya, Ser, Thr, Tia, Tic, Trp, Tyr, Tyr(3-I), Tyr(3-F) oder Val, wobei die genannten Aminosäurereste auch derivatisiert sein können,

A Alkyl mit 1–18 C-Atomen,

Hal F, Cl, Br, I,

Ac Alkanoyl mit 1–10 C-Atomen, Aroyl mit 7–11 C-Atomen oder Aralkanoyl mit 8–12 C-Atomen, wobei die Reste auch

15 partiell fluoriert sein können,

R einen Komplexbildner für radioaktive Isotope wie HS(Me)Ac-Gly-Gly-gAbu-OH für Tc-99m oder Tc(O)-bis-(mercaptoacetamido)-pentansäure, Re(O)-Mercaptoethylthioacetyl-Cys, eine Zuckercarbonsäure oder Ac bedeuten,

20 mit der Maßgabe, daß die Verbindungen auch am N-Atom der Peptidbindung alkyliert und/oder an beliebigen Positionen durch 125-I, 123-I, 3-H, 11-C, 14-C, 18-F, 15-O oder andere radioaktive Isotope markiert sein können,

und wobei, sofern es sich um Reste optisch aktiver Aminosäuren und Aminosäurederivate handelt, sowohl die D- als auch die L-Formen eingeschlossen sind, sowie deren physiologisch unbedenkliche Salze, innere Salze und Solvate.

Ähnliche Verbindungen sind z. B. aus EP 0 406 428 und FEBS Lett. 291, 50–54 (1991) bekannt.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, neue Verbindungen mit wertvollen Eigenschaften aufzufinden, insbesondere solche, die zur Herstellung von Mitteln für bildgebende Verfahren, sowohl in diagnostischer und therapeutischer Hin-

25 sicht, als auch zur Herstellung von Arzneimitteln verwendet werden können. Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die Verbindungen der Formel I und ihre Salze sehr wertvolle Eigenschaften im Hinblick auf die Verwendung zur Diagnose im Rahmen von bildgebenden Verfahren besitzen. Sie eignen sich insbesondere zum Tumor-Imaging.

30 Die Produkte stellen selektive Inhibitoren der Bindung von Liganden an Integrine dar. Für diese Verbindungen ist in vivo eine erhöhte Verweildauer an den entsprechenden Integrinen und dadurch an einem bestimmten Organ oder höhere Gewebespezifität zu erwarten.

Demnach kann z. B. ein Thrombus deshalb besser abgebildet werden, weil das Peptidderivat mit dem Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bevorzugt wechselwirkt.

35 Bei angiogenen Erkrankungen ist eine längere Verweildauer am aktivierten Endothel zu erwarten, da hier eine verstärkte Expression und Aktivierung des Vitronektinrezeptors  $\alpha_v\beta_3$  und  $\alpha_v\beta_3$  (P.C. Brooks et al. Science 264, 569–571(1994), M. Friedlander et al. Science 270, 1500–1502 (1995) beschrieben wurde. Angiogenese wird aber nicht nur für wachsende Primärtumore und Metastasen beschrieben, sondern auch bei Augenerkrankungen, Rheumatoider Arthritis und anderen chronischen Entzündungen (J. Folkman Nature Medicine 1, 27–31 (1995)).

40 Es ist zu erwarten, daß Zustand, Fortschritt und Regression bei diesen Erkrankungen mit Hilfe der hier beschriebenen niedermolekularen Peptidderivaten durch bevorzugte Wechselwirkung mit den sie bindenden Integrinen örtlich und zeitlich gut abgebildet werden können.

Die Verwendung der erfindungsgemäßen Peptide in bildgebenden Verfahren kann z. B. nach folgenden Methoden erfolgen:

1. Röntgenkontrast-Messung (X-Ray-Imaging, Nuclear-Imaging)
2. PET – Positron-Emissions-Tomographie

45 Selecta 28/96 S. 12/L.G. Strauss Dtsch.Med.WSchr. 121, 207 (1996), P.T. Fox et al. Nature 382, 158–162 (1996), L. Farde Acta Psychiatr. Scand. 82 Suppl 358, 67–71(1990), L. Farde TINS 19, 211–214(1996), N.D. Volkow et al. PNAS 94, 2787–2788 (1997).

### 3. MRI – Magnetic Resonance Imaging

55 E. Furman-Haran et al. PNAS 93, 6247–6251 (1996), N.D. Volkow et al. PNAS 94, 2787–2788 (1997).

Es wurde überraschenderweise ferner gefunden, daß die Verbindungen der Formel I und ihre Salze auch sehr wertvolle Eigenschaften im Hinblick auf die Verwendung als Arzneimittel besitzen. Vor allem wirken sie als Integrin-Inhibitoren, wobei sie insbesondere die Wechselwirkungen der  $\beta_3$ - oder  $\beta_5$ -Integrin-Rezeptoren mit Liganden hemmen. Besondere Wirksamkeit zeigen die Verbindungen im Fall der Integrine  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_{IIb}\beta_3$  aber auch gegenüber  $\alpha_v\beta_1$ -,  $\alpha_v\beta_6$ - und  $\alpha_v\beta_8$ -Rezeptoren. Diese Wirkungen können z. B. nach der Methode nachgewiesen werden, die von J.W. Smith et al. in J. Biol. Chem. 265, 12267–12271 (1990) beschrieben wird. Zusätzlich treten antiinflammatorische Effekte auf.

Die Abhängigkeit der Entstehung von Angiogenese von der Wechselwirkung zwischen vaskulären Integrinen und extrazellulären Matrixproteinen ist von P.C. Brooks, R.A. Clark und D.A. Cheresh in Science 264, 569–71 (1994) beschrieben.

65 Die Möglichkeit der Inhibierung dieser Wechselwirkung und die damit verbundene Einleitung von Apoptosis (programmierter Zelltod) angiogener vaskulärer Zellen durch ein cyclisches Peptid ist von P.C. Brooks, A.M. Montgomery, M. Rosenfeld, R.A. Reisfeld, T.-Hu, G. Klier und D.A. Cheresh in Cell 79 1157–64 (1994) beschrieben.

Verbindungen der Formel I, die die Wechselwirkung von Integrinrezeptoren und Liganden, wie z. B. von Fibrinogen

an den Fibrinogenrezeptor (Glycoprotein IIb/IIIa) blockieren, verhindern als GPIIb/IIIa-Antagonisten die Ausbreitung von Tumorzellen durch Metastase. Dies wird durch folgende Beobachtungen belegt:

Die Verbreitung von Tumorzellen von einem lokalen Tumor in das vaskuläre System erfolgt durch die Bildung von Mikroaggregaten (Mikrothromben) durch Wechselwirkung der Tumorzellen mit Blutplättchen. Die Tumorzellen sind durch den Schutz im Mikroaggregat abgeschirmt und werden von den Zellen des Immunsystems nicht erkannt.

Die Mikroaggregate können sich an Gefäßwandungen festsetzen, wodurch ein weiteres Eindringen von Tumorzellen in das Gewebe erleichtert wird. Da die Bildung der Mikrothromben durch Fibrinogenbindung an die Fibrinogenrezeptoren auf aktivierten Blutplättchen vermittelt wird, können die GPIIa/IIIb-Antagonisten als wirksame Metastase-Hemmer angesehen werden.

Die Verbindungen der Formel I können ferner als antimikrobiell wirkende Substanzen bei Operationen eingesetzt werden, wo Biomaterialien, Implantate, Katheter oder Herzschrittmacher eingesetzt werden. Dabei wirken sie antiseptisch. Die Wirksamkeit der antimikrobiellen Aktivität kann durch das von P. Valentin-Weigund et al., in *Infection and Immunity*, 2851-2855 (1988) beschriebene Verfahren nachgewiesen werden.

Da die Verbindungen der Formel I Inhibitoren der Fibrinogenbindung und damit Liganden der Fibrinogenrezeptoren auf Blutplättchen darstellen, können sie als Diagnostika zur Detektion und Lokalisierung von Thromben im vaskulären System in vivo verwendet werden, sofern sie durch einen UV-detektierbaren Rest substituiert werden.

Die Verbindungen der Formel I können als Inhibitoren der Fibrinogenbindung auch als wirksame Hilfsmittel zum Studium des Metabolismus von Blutplättchen in unterschiedlichen Aktivierungsstadien oder von intrazellulären Signalmechanismen des Fibrinogenrezeptors verwendet werden. Die detektierbare Einheit eines einzubauenden "Labels", z. B. Biotinyl, erlaubt es, nach Bindung an den Rezeptor, genannte Mechanismen zu untersuchen.

Die Verbindungen haben also die Eigenschaft, die Bindung natürlicher oder künstlicher Liganden an Integrine, speziell der Integrine  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_5$  und  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , aber auch von  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_6$  und  $\alpha_v\beta_8$  zu inhibieren.

Sie haben zudem noch den Vorteil zum Stand der Technik, daß durch N-Alkylierung einer oder mehrerer Peptidbindungen eine metabolische Stabilisierung und erhöhte Fettlöslichkeit erreicht wird. Durch die Reduzierung der möglichen Wasserstoffbrücken, denn N-Alkyl kann kein H-Donor für C=O sein, verbessert sich die Penetrationsfähigkeit durch Membranen, so daß eine erhöhte orale Resorbierbarkeit erhalten werden kann, zu dem kann eine gesteigerte Plasmaproteinbindung auftreten.

Die N-Alkylierung der Peptidbindung steigert die inhibitorische Potenz der Verbindungen und erhöht die Selektivität der Inhibitorisierung in bezug auf bestimmte Integrine. Insbesondere durch die Position und die Anzahl der N-Alkyl-Gruppen kann die Selektivität beeinflußt werden.

Die Verbindungen können als Arzneimittelwirkstoffe in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt werden, insbesondere zur Prophylaxe und zur Behandlung von Erkrankungen des Kreislaufs, Thrombose, Herzinfarkt Arteriosklerose, Entzündungen, Apoplexie, Angina pectoris, Tumorerkrankungen, osteolytischen Erkrankungen, insbesondere Osteoporose, Angiogenese und durch Angiogenese bedingte Erkrankungen, wie z. B. der diabetischen Retinopathie des Auges, makularer Degeneration, Myopie, okularer Histoplasmose, rheumatischer Arthritis, Osteoarthritis, rubeotischem Glaukom, aber auch ulcerativen Colitis, Morbus Crohn, Psoriasis sowie Restenose nach Angioplastie. Ferner können die Verbindungen zur Verbesserung und Unterstützung von Wundheilungsprozessen bei mikrobiellen Infekten und bei akutem Nierenversagen eingesetzt werden.

Diese Wirkungen können z. B. mit Hilfe von literaturbekannten Methoden, wie sie z. B. von P.C. Brooks et al. in *Cell* 79 1157-1164 (1994) oder *Science* 264, 569-571 (1994) beschrieben werden, nachgewiesen werden.

Die vor- und nachstehend aufgeführten Abkürzungen von Aminosäureresten stehen für die Reste folgender Aminosäuren:

Abu	4-Aminobuttersäure	
Aha	6-Aminohexansäure	
Ala	Alanin	45
Asn	Asparagin	
Asp	Asparaginsäure	
Asp(OR)	Asparaginsäure ( $\beta$ -ester)	
Arg	Arginin	50
Cha	3-Cyclohexylalanin	
Cit	Citrullin	
Cys	Cystein	
Dab	2,4-Diaminobuttersäure	
Dap	2,3-Diaminpropionsäure	55
Gln	Glutamin	
Glu	Glutaminsäure	
Gly	Glycin	
His	Histidin	
Ile	Isoleucin	60
Leu	Leucin	
Lys	Lysin	
Lys(Ac)	Nc-Alkanoyllysin	
Lys(AcNH <sub>2</sub> )	Ne-Aminoalkanoyllysin	
Lys(AcSH)	Ne Mercaptoalkanoyllysin	65
Met	Methionin	
Nal	3-(2-Naphthyl)-alanin	
Nle	Norleucin	

Orn	Ornithin
Phe	Phenylalanin
4-Hal-Phe	4-Halogen-phenylalanin
Phg	Phenylglycin
5 Pro	Prolin
Py	3-(2-Pyridyl)-alanin
Sar	Sarcosin (N-Methylglycin)
Ser	Serin
Tia	3-(2-Thienyl)-alanin
10 Tic	Tetrahydroisochinolin-3-carbonsäure
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

15 Ferner bedeuten nachstehend:

BOC	tert-Butoxycarbonyl
Bzl	Benzyl
20 DCCl	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	Dimethylformamid
EDCl	N-Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid
Et	Ethyl
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
25 HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Me	Methyl
Mtr	4-Methoxy-2,3,6-trimethylphenyl-sulfonyl
NMe	N-methylierte $\alpha$ -Aminogruppe
OBu	tert.-Butylester
30 OMe	Methylester
OEt	Ethylester
POA	Phenoxyacetyl
Isopropyl	n-Propyl
TBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluorborat
35 TFA	Trifluoressigsäure
ZAS	3-Acetamido-2,6-anhydro-4,5,7-tri-O-benzyl-3-deoxy $\beta$ -D-glycero-D-gulo-heptansäure
Z	Carbobenzoxy-Rest

40 Sofern die vorstehend genannten Aminosäuren in mehreren enantiomeren Formen auftreten können, so sind vor- und nachstehend, z. B. als Bestandteil die Verbindungen der Formel I, alle diese Formen und auch ihre Gemische (z. B. die DL-Formen) eingeschlossen. Ferner können die Aminosäuren, z. B. als Bestandteil von Verbindungen der Formel I, mit entsprechenden an sich bekannten Schutzgruppen versehen sein.

45 Ferner werden von der Erfindung auch solche Peptide eingeschlossen deren Aminosäurereste teilweise oder vollständig derivatisiert sind. Unter "derivatisiert" ist zu verstehen, daß auch sogenannte "Prodrugs", wie z. B. N-Guanidinoacylderivate von Arg,  $\beta$ -Ester von Asp, Ne-Alkanoyl-, -Aminoalkanoyl-, -Mercaptoalkanoyl-Derivate des Lysins, um nur einige zu nennen, eingeschlossen werden. Außerdem können die Aminosäurereste teilweise C-alpha-alkyliert oder, z. B. für diagnostische Zwecke, isotopenmarkiert sein. Weiterhin sind solche Verbindungen der Formel I eingeschlossen, die in den Seitenketten der Bausteine D und E zusätzlich durch Amino-, Carboxy- oder Mercaptogruppen derivatisiert sind, da derartige Derivate wichtige Ausgangsverbindungen zur Herstellung höhermolekularer Konjugate, z. B. für Immunisierungszwecke und Antikörperherstellung sind. Ferner ist es möglich, funktionelle Gruppen in der Seitenkette bestimmter Aminosäurereste oder derivatisierter Aminosäurereste zur Immobilisierung der Peptide auf Polymermaterialien für die Herstellung von Affinitätschromatographiesäulen zu verwenden oder die funktionellen Gruppen zur Derivatisierung mit diagnostischen Hilfsreagenzien, wie fluoreszierenden Substituenten zu nutzen.

55 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel I nach Anspruch 1 oder eines ihrer Salze, dadurch gekennzeichnet, daß man sie aus einem ihrer funktionellen Derivate durch Behandeln mit einem solvolysierenden oder hydrogenolysierenden Mittel in Freiheit setzt oder daß man ein Peptid der Formel II

60 H-Z-OH II

worin

Z -Arg-Gly-Asp-D-E-

-Gly-Asp-D-E-Arg-

65 -Asp-D-E-Arg-Gly-

-D-E-Arg-Gly-Asp- oder

-E-Arg-Gly-Asp-D- bedeutet,

oder ein reaktionsfähiges Derivat eines solchen Peptids mit einem cyclisierenden Mittel behandelt,

oder daß man ein Cyclopeptid, welches an sich der Formel I entspricht, aber über eine oder mehrere freie Aminogruppen, Säuregruppen und/oder aktivierte  $\alpha$ -C-Atome verfügt durch Alkylierung, Acylierung oder Veresterung derivatisiert und/oder daß man eine basische oder saure Verbindung der Formel I durch Behandeln mit einer Säure oder Base in eines ihrer Salze überführt.

Vor- und nachstehend haben die Reste D, E und n die bei den Formeln I und II angegebenen Bedeutungen, sofern nicht ausdrücklich etwas anderes angegeben ist. Die verwendeten Buchstaben für die jeweiligen Reste stehen in keinem Zusammenhang mit dem Einbuchstaben-Code für Aminosäuren.

In den vorstehenden Formeln steht Alkyl vorzugsweise für Methyl, Ethyl, Isopropyl, n-Butyl, sec.-Butyl oder tert.-Butyl.

Die Gruppen D und E sind vorzugsweise Phe, auch bevorzugt D-Phe, aber auch Phe(4-OA), Phe(4-Hal), besonders Phe(4-I) sowie His, Trp, Tyr, Tyr(3-F), Tyr(3-I), Val, Lys(R), homo-Phe, Nal oder Phg, wobei die D-Formen auch gleichermaßen bevorzugt sind.

E ist ferner vorzugsweise ein hydrophober Aminosäurerest, insbesondere Gly, Ala, Val, Leu, Nle oder Ile. Die Variable n steht vorzugsweise für N-Methyl-, N-Ethyl-, N-Propyl-, N-Benzyl- oder N-Isopropyl-substituierte  $\alpha$ -Aminogruppen im Peptid, wobei mehrere Aminosäurereste mit gleichen oder unterschiedlichen Alkylresten N-substituiert sein können.

R ist vorzugsweise ein Komplexbildner für radioaktive Isotope wie HS(Me)Ac-Gly-Gly-gAbu-OH für Tc-99m oder Tc(O)-bis-(mercaptoacetamido)-pentansäure, Re(O)-Mercaptoethylthioacetyl-Cys, eine Zuckercarbonsäure, wie 3-Acetamido-2,6-anhydro-4,5,7-tri-O-benzyl-3-deoxy $\beta$ -D-glycero-D-gulo-heptansäure (ZAS) oder Ac, wobei Ac besonders bevorzugt Acetyl oder 4-Fluorbenzoyl ist.

Die Komplexbildner R für radioaktive Isotope werden in folgenden Referenzen beschrieben: HS(Me)Ac-Gly-Gly-gAbu-OH für Tc-99m oder Tc(O)-bis-(mercaptoacetamido)-pentansäure – vgl. TD Harris et al. in Bioorg. & Med. Chem. Lett. 6, 1737–1740 (1996), M. Rajopadhye et al. Bioorg. & Med. Chem. Lett. 6, 1737–1740 (1996) und DA Pearson et al. J. Med. Chem. 39, 1372–1382 (1996),

Dementsprechend sind Gegenstand der Erfindung insbesondere diejenigen Verbindungen der Formel I, in denen mindestens einer der genannten Reste eine der vorstehend angegebenen bevorzugten Bedeutungen hat.

Eine bevorzugte Gruppe von Verbindungen kann durch die Teilformel Ia ausgedrückt werden, die sonst der Formel I entspricht, worin jedoch

D D-Phe, Phe, D-Trp, Trp, D-Tyr, Tyr, Tyr(3-I), Tyr(PO(O-phenyl)<sub>2</sub>), D-homoPhe, homoPhe, D-Nal, Nal, D-Phg, Phg oder Phe(4-Hal) (D- oder L-Form) und

E Val, Gly, Ala, Leu, Ile, Lys, Lys(ZAS), Lys(Re(O)-mercaptoethylthioacetyl-Cys Tyr, Tyr(3-I), Tyr(PO(O-phenyl)<sub>2</sub>), Phe(4-Hal) (D- oder L-Form) oder Nle bedeuten.

Ferner sind alle physiologisch verträglichen Salze, inneren Salze und Solvate der unter die Teilformel Ia fallenden Verbindungen besonders bevorzugt.

Die Verbindungen der Formel I und auch die Ausgangsstoffe zu ihrer Herstellung werden im übrigen nach bekannten Methoden hergestellt, wie sie in der Literatur (z. B. in den Standardwerken wie Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart) beschrieben sind, und zwar unter Reaktionsbedingungen, die für die genannten Umsetzungen bekannt und geeignet sind. Dabei kann man auch von bekannten, hier nicht näher erwähnten Varianten Gebrauch machen.

Die Ausgangsstoffe können, falls erwünscht, auch in situ gebildet werden, so daß man sie aus dem Reaktionsgemisch nicht isoliert, sondern sofort weiter zu den Verbindungen der Formel I umsetzt.

Die Verbindungen der Formel I können erhalten werden, indem man sie aus ihren funktionellen Derivaten durch Solvolyse, insbesondere Hydrolyse, oder durch Hydrogenolyse in Freiheit setzt.

Bevorzugte Ausgangsstoffe für die Solvolyse bzw. Hydrogenolyse sind solche, die anstelle einer oder mehrerer freier Amino- und/oder Hydroxygruppen entsprechende geschützte Amino- und/oder Hydroxygruppen enthalten, vorzugsweise solche, die anstelle eines H-Atoms, das mit einem N-Atom verbunden ist, eine Aminoschutzgruppe tragen, z. B. solche, die der Formel I entsprechen, aber anstelle einer NH<sub>2</sub>-Gruppe eine NHR'-Gruppe (worin R' eine Aminoschutzgruppe bedeutet, z. B. BOG oder CBZ) enthalten.

Ferner sind Ausgangsstoffe bevorzugt die anstelle des H-Atoms einer Hydroxygruppe eine Hydroxyschutzgruppe tragen, z. B. solche, die der Formel I entsprechen, aber anstelle einer Hydroxyphenylgruppe eine R'O-phenylgruppe enthalten (worin R' eine Hydroxyschutzgruppe bedeutet).

Es können auch mehrere – gleiche oder verschiedene – geschützte Amino- und/oder Hydroxygruppen im Molekül des Ausgangsstoffes vorhanden sein. Falls die vorhandenen Schutzgruppen voneinander verschieden sind, können sie in vielen Fällen selektiv abgespalten werden.

Der Ausdruck "Aminoschutzgruppe" ist allgemein bekannt und bezieht sich auf Gruppen, die geeignet sind, eine Aminogruppe vor chemischen Umsetzungen zu schützen (zu blockieren), die aber leicht entfernbare sind, nachdem die gewünschte chemische Reaktion an anderen Stellen des Moleküls durchgeführt worden ist. Typisch für solche Gruppen sind insbesondere unsubstituierte oder substituierte Acyl-, Aryl-, Aralkoxymethyl- oder Aralkylgruppen. Da die Aminoschutzgruppen nach der gewünschten Reaktion (oder Reaktionsfolge) entfernt werden, ist ihre Art und Größe im übrigen nicht kritisch; bevorzugt werden jedoch solche mit 1–20, insbesondere 1–8 C-Atomen. Der Ausdruck "Acygruppe" ist im Zusammenhang mit dem vorliegenden Verfahren in weitestem Sinne aufzufassen. Er umschließt von aliphatischen, araliphatischen, aromatischen oder heterocyclischen Carbonsäuren oder Sulfonsäuren abgeleitete Acylgruppen sowie insbesondere Alkoxycarbonyl-, Aryloxycarbonyl- und vor allem Aralkoxycarbonylgruppen. Beispiele für derartige Acylgruppen sind Alkanoyl wie Acetyl, Propionyl, Butyryl; Aralkanoyle wie Phenylacetyl; Aroyl wie Benzoyl oder Toluylyl; Alkoxycarbonyl wie POA; Alkoxycarbonyl wie Methoxycarbonyl, Ethoxycarbonyl, 2,2,2-Trichlorethoxycarbonyl, BOG, 2-Jodethoxycarbonyl; Aralkyloxycarbonyl wie CBZ ("Carbobenzoxyl"), 4-Methoxybenzyloxycarbonyl, FMOC; Arylsulfonyl wie Mtr. Bevorzugte Aminoschutzgruppen sind BOG und Mtr, ferner CBZ, Fmoc, Benzyl und Acetyl.

Der Ausdruck "Hydroxyschutzgruppe" ist ebenfalls allgemein bekannt und bezieht sich auf Gruppen, die geeignet sind, eine Hydroxygruppe vor chemischen Umsetzungen zu schützen, die aber leicht entfernbare sind, nachdem die gewünschte chemische Reaktion an anderen Stellen des Moleküls durchgeführt worden ist. Typisch für solche Gruppen sind die oben genannten unsubstituierten oder substituierten Aryl-, Alkyl- oder Acylgruppen, ferner auch Alkylgruppen. Die Natur und Größe der Hydroxyschutzgruppen ist nicht kritisch, da sie nach der gewünschten chemischen Reaktion oder Reaktionsfolge wieder entfernt werden; bevorzugt sind Gruppen mit 1–20, insbesondere 1–10 C-Atomen. Beispiele für Hydroxyschutzgruppen sind u. a. Benzyl, p-Nitrobenzoyl, p-Toluolsulfonyl, tert. Butyl und Acetyl, wobei Benzyl und tert. Butyl besonders bevorzugt sind. Die COOH-Gruppen in Asparaginsäure und Glutaminsäure werden bevorzugt in Form ihrer tert.-Butylester geschützt (z. B. Asp(OBt)).

Die Ausgangsstoffe zu verwendenden funktionellen Derivate der Verbindungen der Formel I können nach üblichen Methoden der Aminosäure- und Peptidsynthese hergestellt werden, wie sie z. B. in den genannten Standardwerken und Patentanmeldungen beschrieben sind, z. B. auch nach der Festphasenmethode nach Merrifield (B.F. Gysin u. R.B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 94, 3102 ff. (1972)).

Das In-Freiheit-Setzen der Verbindungen der Formel I aus ihren funktionellen Derivaten gelingt – je nach der benutzten Schutzgruppe – z. B. mit starken Säuren, zweckmäßig mit TFA oder Perchlorsäure, aber auch mit anderen starken organischen Säuren wie Salzsäure oder Schwefelsäure, starken organischen Carbonsäuren wie Trichloressigsäure oder Sulfonsäuren wie Benzol- oder p-Toluolsulfonsäure. Die Anwesenheit eines zusätzlichen inerten Lösungsmittels ist möglich, aber nicht immer erforderlich. Als inerte Lösungsmittel eignen sich vorzugsweise organische, beispielsweise Carbonsäuren wie Essigsäure, Ether wie Tetrahydrofuran oder Dioxan, Amide wie DMF, halogenierte Kohlenwasserstoffe wie Dichlormethan, ferner auch Alkohole wie Methanol, Ethanol oder Isopropanol sowie Wasser. Ferner kommen Gemische der vorgenannten Lösungsmittel in Frage. TFA wird vorzugsweise im Überschuß ohne Zusatz eines weiteren Lösungsmittels verwendet, Perchlorsäure in Form eines Gemisches aus Essigsäure und 70%iger Perchlorsäure im Verhältnis 9 : 1. Die Reaktionstemperaturen für die Spaltung liegen zweckmäßig zwischen etwa 0 und etwa 50°, vorzugsweise arbeitet man zwischen 15 und 30° (Raumtemperatur).

Die Gruppen BOC, OBt und Mtr können z. B. bevorzugt mit TFA in Dichlormethan oder mit etwa 3 bis 5 n HCl in Dioxan bei 15–30° abgespalten werden, die FMOC-Gruppe mit einer etwa 5- bis 50%igen Lösung von Dimethylamin, Diethylamin oder Piperidin in DMF bei 15–30°.

Hydrogenolytisch entfernbare Schutzgruppen (z. B. CBZ oder Benzyl) können z. B. durch Behandeln mit Wasserstoff in Gegenwart eines Katalysators (z. B. eines Edelmetallkatalysators wie Palladium, zweckmäßig auf einem Träger wie Kohle) abgespalten werden. Als Lösungsmittel eignen sich dabei die oben angegebenen, insbesondere z. B. Alkohole wie Methanol oder Ethanol oder Amide wie DMF. Die Hydrogenolyse wird in der Regel bei Temperaturen zwischen etwa 0 und 100° und Drucken zwischen etwa 1 und 200 bar, bevorzugt bei 20–30° und 1–10 bar durchgeführt. Eine Hydrogenolyse der CBZ-Gruppe gelingt z. B. gut an 5 bis 10%igem Pd-C in Methanol oder mit Ammoniumformiat (anstelle von H<sub>2</sub>) an Pd-C in Methanol/DMF bei 20–30°.

Verbindungen der Formel I können auch durch Cyclisierung von Verbindungen der Formel II unter den Bedingungen einer Peptidsynthese erhalten werden. Dabei arbeitet man zweckmäßig nach üblichen Methoden der Peptid-Synthese, wie sie z. B. in Houben-Weyl, 1.c., Band 15/II, Seiten 1 bis 806 (1974) beschrieben sind.

Die Reaktion gelingt vorzugsweise in Gegenwart eines Dehydratisierungsmittels, z. B. eines Carbodiimids wie DCCl oder EDCl, ferner Propanphosphonsäureanhydrid (vgl. Angew. Chem. 92, 129 (1980)), Diphenylphosphorylazid oder 2-Ethoxy-N-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin, in einem inerten Lösungsmittel, z. B. einem halogenierten Kohlenwasserstoff wie Dichlormethan, einem Ether wie Tetrahydrofuran oder Dioxan, einem Amid wie DMF oder Dimethylacetamid, einem Nitril wie Acetonitril, oder in Gemischen dieser Lösungsmittel, bei Temperaturen zwischen etwa –10 und 40°, vorzugsweise zwischen 0 und 30°. Um die intramolekulare Cyclisierung vor der intermolekularen Peptid-Bindung zu fördern, ist es zweckmäßig, in verdünnten Lösungen zu arbeiten (Verdünnungsprinzip).

Anstelle von II können auch geeignete reaktionsfähige Derivate dieser Stoffe in die Reaktion eingesetzt werden, z. B. solche, in denen reaktive Gruppen intermediär durch Schutzgruppen blockiert sind. Die Aminosäurederivate II können z. B. in Form ihrer aktivierten Ester verwendet werden, die zweckmäßig in situ gebildet werden, z. B. durch Zusatz von HOBt oder N-Hydroxysuccinimid.

Die Ausgangsstoffe der Formel II sind in der Regel neu. Sie können nach bekannten Methoden, z. B. den oben angegebenen Methoden der Peptidsynthese und der Abspaltung von Schutzgruppen, hergestellt werden.

In der Regel synthetisiert man zunächst geschützte Pentapeptidester der Formel R'-Z-OR", z. B. BOC-Z-O Me oder BOC-Z-OEt, die zunächst zu Säuren der Formel R'-Z-OH, z. B. BOC-Z-OH verseift werden; aus diesen wird die Schutzgruppe R' abgespalten, wodurch man die freien Peptide der Formel H-Z-OH (II) erhält.

Die Derivatisierung eines Cyclopeptides, welches an sich einer Verbindung der Formel I entspricht, erfolgt ebenfalls über an sich bekannte Methoden, wie sie für die Alkylierung von Aminen, die Veresterung von Carbonsäuren oder die nucleophile Substitution an aliphatischen C-Atomen bekannt und in jedem Lehrbuch der Organischen Chemie, z. B. J. Marck, Ado. Org. Chem., John Wiley & Sons N.Y. (1985), beschrieben sind.

Eine Base der Formel I kann mit einer Säure in das zugehörige Säureadditionssalz übergeführt werden. Für diese Umsetzung kommen insbesondere Säuren in Frage, die physiologisch unbedenkliche Salze liefern. So können anorganische Säuren verwendet werden, z. B. Schwefelsäure, Salpetersäure, Halogenwasserstoffsäuren wie Chlorwasserstoffsäure oder Bromwasserstoffsäure, Phosphorsäuren wie Orthophosphorsäure, Sulfaminsäure, ferner organische Säuren, insbesondere aliphatische, alicyclische, araliphatische, aromatische oder heterocyclische ein- oder mehrbasige Carbon-, Sulfon- oder Schwefelsäuren, z. B. Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Pivalinsäure, Diethylessigsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Pimelinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Milchsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Benzoesäure, Salicylsäure, 2- oder 3-Phenylpropionsäure, Citronensäure, Glucuronsäure, Ascorbinsäure, Nicotinsäure, Isonicotinsäure, Methan- oder Ethansulfonsäure, Ethandisulfonsäure, 2-Hydroxyethansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Naphthalin-mono- und -disulfonsäuren, Laurylschwefelsäure. Salze mit physiologisch nicht unbedenklichen Säuren, z. B. Pikrate, können zur Isolierung und/oder Aufreinigung der Verbindungen der Formel I verwendet werden.

Andererseits kann eine Säure der Formel I durch Umsetzung mit einer Base in eines ihrer physiologisch unbedenklichen Metall- oder Ammoniumsalze übergeführt werden. Als Salze kommen dabei insbesondere die Natrium-, Kalium-, Magnesium-, Calcium- und Ammoniumsalze in Betracht, ferner substituierte Ammoniumsalze, z. B. die Dimethyl-, Diethyl- oder Diisopropylammoniumsalze, Monoethanol-, Diethanol- oder Triethanolammoniumsalze, Cyclohexyl-, Dicyclohexylammoniumsalze, Dibenzylethylendiammoniumsalze, weiterhin z. B. Salze mit N-Methyl-D-glucamin oder mit Arginin oder Lysin. 5

Die neuen Verbindungen der Formel I und ihre physiologisch unbedenklichen Salze können zur Herstellung pharmazeutischer Präparate verwendet werden, indem man sie zusammen mit mindestens einem Träger- oder Hilfsstoff und, falls erwünscht, zusammen mit einem oder mehreren weiteren Wirkstoff(en) in eine geeignete Dosierungsform bringt. Die so erhaltenen Zubereitungen können als Arzneimittel in der Human- oder Veterinärmedizin eingesetzt werden. Als Trägersubstanzen kommen organische oder anorganische Stoffe in Frage, die sich für die enterale (z. B. orale oder rektale), parenterale (z. B. intravenöse Injektion) oder lokale (z. B. topische, dermale, ophthalmische oder nasale) Applikation oder für eine Applikation in Form eines Inhalations-Sprays eignen und mit den neuen Verbindungen nicht reagieren, beispielsweise Wasser oder wässrige isotonische Kochsalzlösung, niedere Alkohole, pflanzliche Öle, Benzylalkohole, Polyethylenglykole, Glycerintriacetat und andere Fettsäureglyceride, Gelatine, Sojalecithin, Kohlehydrate wie Lactose oder Stärke, Magnesiumstearat, Talk, Cellulose, Vaseline. Zur oralen Anwendung dienen insbesondere Tabletten, Dragees, Kapseln, Sirupe, Säfte oder Tropfen; von Interesse sind speziell Lacktabletten und Kapseln mit magensaftresistenten Überzügen bzw. Kapselhüllen. Zur rektalen Anwendung dienen Suppositorien, zur parenteralen Applikation Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate. Zur topischen Anwendung eignen sich z. B. Lösungen, die in Form von Augentropfen verwendet werden können, ferner z. B. Suspensionen, Emulsionen, Cremes, Salben oder Komprimat. Für die Applikation als Inhalations-Spray können Sprays verwendet werden, die den Wirkstoff entweder gelöst oder suspendiert in einem Treibgas oder Treibgasgemisch (z. B. CO<sub>2</sub> oder Fluorchlorkohlenwasserstoffersatzstoffe) enthalten. Zweckmäßig verwendet man den Wirkstoff dabei in mikronisierter Form, wobei ein oder mehrere zusätzliche physiologisch verträgliche Lösungsmittel zugegen sein können, z. B. Ethanol. Inhalationslösungen können mit Hilfe üblicher Inhalatoren verabfolgt werden. Die neuen Verbindungen können auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z. B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Die Injektionen können dabei als Bolus oder als kontinuierliche Infusion (z. B. intravenös, intramuskulär, subcutan oder intrathecal) gegeben werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen, Farb- und/oder Aromastoffe enthalten. Sie können, falls erwünscht, auch einen oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten, z. B. auch ein oder mehrere Vitamine. 10 15 20 25 30

Die erfindungsgemäßen Substanzen können in der Regel in Analogie zu anderen bekannten, im Handel befindlichen Peptiden, insbesondere aber in Analogie zu den in der US-A-4 472 305 beschriebenen Verbindungen verabreicht werden, vorzugsweise in Dosierungen zwischen etwa 0,05 und 500, insbesondere zwischen 0,5 und 100 mg pro Dosierungseinheit. Die tägliche Dosierung liegt vorzugsweise zwischen etwa 0,01 und 2 mg/kg Körpergewicht. Die spezielle Dosis für jeden bestimmten Patienten hängt jedoch von den verschiedensten Faktoren ab, beispielsweise von der Wirksamkeit der eingesetzten speziellen Verbindung, vom Alter, Körpergewicht, allgemeinen Gesundheitszustand, Geschlecht, von der Kost, vom Verabfolgungszeitpunkt und -weg, von der Ausscheidungsgeschwindigkeit, Arzneistoffkombination und Schwere der jeweiligen Erkrankung, welcher die Therapie gilt. Die parenterale Applikation ist bevorzugt. 35 40

Ferner können die neuen Verbindungen der Formel I als Integrinliganden zur Herstellung von Säulen für die Affinitätschromatographie zur Reindarstellung von Integrinen verwendet werden. 40

Der Ligand, d. h. ein Peptidderivat der Formel I, wird dabei über Ankerfunktionen an einen polymeren Träger kovalent gekuppelt.

Als polymere Trägermaterialien eignen sich die an sich in der Peptidchemie bekannten polymeren festen Phasen mit vorzugsweise hydrophilen Eigenschaften, beispielsweise quervernetzte Polyzucker, wie Zellulose, Sepharose oder Sephadex®, Acrylamide, Polymer auf Polyethylenglykolbasis oder Tentakelpolymere®. 45

Als Ankerfunktionen, die mit den polymeren Trägern verknüpft sind, eignen sich vorzugsweise lineare Alkylenketten mit 2–12 C-Atomen, die mit einem Ende direkt an das Polymer gebunden sind und am anderen Ende eine funktionelle Gruppe, wie z. B. Hydroxy, Amino, Mercapto, Maleinimido oder -COOH aufweisen und dazu geeignet sind, mit dem C- oder N-terminalen Abschnitt des jeweiligen Peptids verknüpft zu werden. 50

Dabei ist es möglich, daß das Peptid direkt oder ebenfalls über eine zweite Ankerfunktion mit dem Anker des Polymers verbunden ist. Ferner ist es möglich, daß Peptide, die Aminosäurereste mit funktionalisierten Seitenketten enthalten, über diese mit der Ankerfunktion des Polymers verbunden werden.

Darüber hinaus können bestimmte Aminosäurereste, die Bestandteil der Peptide der Formel I sind, in ihren Seitenketten derart modifiziert werden, so daß sie zur Verankerung über z. B. SH-, OH-, NH<sub>2</sub>- oder COOH-Gruppen mit dem Anker des Polymers zur Verfügung stehen. 55

Möglich sind hierbei ungewöhnliche Aminosäuren, wie z. B. Phenylalaninderivate, die in 4-Position des Phenylrings eine Mercapto-, Hydroxy-, Amino- oder Carboxyalkylkette tragen, wobei die funktionelle Gruppe sich am Ende der Kette befindet.

Beispiele für Aminosäurereste, deren Seitenkette direkt als Ankerfunktion dienen kann, sind z. B. Lys, Orn, Arg, Dab, Dap, Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Thr, Cys, Cit oder Tyr. 60

Beispiele für N-terminale Anker sind Reste wie z. B. -CO-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>-NH<sub>2</sub>, -CO-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>-OH, -CO-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>-SH oder -CO-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>-COOH mit n = 2–12, wobei die Länge der Alkylenkette nicht kritisch ist und diese gegebenenfalls auch z. B. durch entsprechende Aryl- oder Alkylarylreste ersetzt werden kann.

C-terminale Anker können beispielsweise -O-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>-SH-, -O-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>-OH, -O-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>-NH<sub>2</sub>, -O-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>-COOH, -NH-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>-SH, -NH-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>-OH, -NH-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>-NH<sub>2</sub> oder -NH-C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>-COO sein, wobei für n sowie die Alkylenkette das bereits im vorhergehenden Abschnitt Gesagte gilt. 65

Die N- und C-terminalen Anker können auch als Ankerbaustein für eine bereits funktionalisierte Seitenkette eines



Aminosäurerests dienen. Es können hier beispielsweise Aminosäurereste wie Lys ( $\text{CO}-\text{C}_5\text{H}_{10}-\text{NH}_2$ ), Asp( $\text{NH}-\text{C}_3\text{H}_6-\text{COOH}$ ) oder Cys( $\text{C}_3\text{H}_6-\text{NH}_2$ ) in Frage, wobei der Anker immer an die funktionelle Gruppe der Seitenkette gebunden ist.

Die Herstellung der Materialien für die Affinitätschromatographie zur Integrinreinigung erfolgt unter Bedingungen wie sie für die Kondensation von Aminosäuren üblich und an sich bekannt sind und bereits im Abschnitt zur Herstellung der Verbindungen der Formel I geschildert wurden.

Neben der Verwendung der Cyclopeptide zur Immobilisierung auf Polymermaterialien für die Herstellung von Affinitätschromatographiesäulen ist es möglich, die Verbindungen mit ihren funktionalisierten Seitenketten zur weiteren Derivatisierung mit diagnostischen Hilfsreagenzien, wie z. B. fluoreszierenden Substituenten, zu nutzen.

Es ist ferner möglich, in den Seitenketten der Reste D und E zusätzlich funktionelle Gruppen wie Amino-, Mercapto- oder Carboxygruppen einzuführen, über die dann Konjugate mit Proteinen oder anderen hochmolekularen Substanzen, wie z. B. für Immunisierungszwecke und/oder Antikörpererzeugung, hergestellt werden können.

Vor- und nachstehend sind alle Temperaturen in °C angegeben. In den nachfolgenden Beispielen bedeutet "übliche Aufarbeitung": Man gibt, falls erforderlich, Wasser hinzu, neutralisiert, extrahiert mit Ether oder Dichlorethan, trennt ab, trocknet die organische Phase über Natriumsulfat, filtriert, dampft ein und reinigt durch Chromatographie an Kieselgel und/oder Kristallisation. RZ = Retentionszeit (Minuten). Die analytische Untersuchung erfolgte durch HPLC an Lichrosorb® RP select B (7 µm)-250 × 4 mm-Säule, Eluent A: 0,3% TFA in Wasser; Eluent B: 0,3% TFA in 2-Propanol/Wasser (8 : 2) Gradient 1-99% B in 50 Min. bei 1 ml/Min. Fluß und Detektion bei 215 nm. M+ = Molekular-Peak im Massenspektrum, erhalten nach der "Fast Atom Bombardment"-Methode (FAB).

#### Beispiel 1

Eine Lösung von 0,6 g H-Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-Tyr(3-I)-Val-ONa [z. B. erhältlich aus Fmoc-Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-Tyr(3-I)-Val-O-Wang, wobei -O-Wang den bei den modifizierten Merrifield-Techniken verwendeten Rest eines 4-Oxymethyl-phenoxymethyl-polystyrolharzes bedeutet, durch Abspaltung der Fmoc-Gruppe mit Piperidin/DMF und Abspaltung des Harzes mit TFA/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 : 1)] in 15 ml DMF wird mit 85 ml Dichlormethan verdünnt und mit 50 mg  $\text{NaHCO}_3$  versetzt. Nach Kühlung in einer Trockeneis/Aceton-Mischung werden 40 µl Diphenylphosphorylazid zugegeben. Nach 16 Stunden Stehen bei Raumtemperatur engt man die Lösung ein. Das Konzentrat wird gefiltriert (Sephadex G10-Säule in Isopropanol/Wasser 8 : 2) und dann wie üblich mittels HPLC gereinigt. Man erhält nach Behandlung mit TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  (98 : 2) Cyclo-(Arg-Gly-Asp-Tyr(3-I)-Val); RZ = 22,2; FAB-MS (M+H): 717.

Analog erhält man durch Cyclisierung der entsprechenden linearen Peptide und Abspaltung der Schutzgruppen:

Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DTyr(3-F)-Val);

Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys); RZ = 13,2; FAB-MS (M+H): 620;

Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Tyr(3-F));

Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DTyr(3-I)-Lys(ZAS));

Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Tyr(3-I)); RZ = 24,3; FAB-MS (M+H): 765;

Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys( $\text{CO}-(4\text{-F-phenyl})$ )); RZ = 24,4; FAB-MS (M+H): 726;

Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys( $\text{Re}(\text{O})$ -mercaptoethylthio-Cys)); RZ = 23,1;

FAB-MS (M+H): 1041;

Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Tyr(3-I,  $\text{OP}(\text{O-phenyl})_2$ )); RZ = 32,9; FAB-MS (M+H): 997;

Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DTyr(3-I,  $\text{OP}(\text{O-phenyl})_2$ -Val); RZ = 30,9; FAB-MS (M+H): 949.

#### Beispiel 2

Synthese von c(RGDFK(ZAS1)):

Die Synthese des Zuckerbausteins 3-Acetamido-2,6-anhydro-4,5,7-tri-O-benzyl-3-deoxy-β-D-glycero-D-gulo-heptansäure wurde analog der folgenden Literatur durchgeführt:

M. Hoffmann, F. Burkhart, G. Hessler, H. Kessler, *Helv. Chim. Acta* 1996, 79, 1519.

Die Synthese des geschützten zyklischen Peptides Cyclo-(Arg(Mtr)-Gly-Asp(OtBu)-D-Tyr(tBu)-Lys(Z)) erfolgt analog Beispiel 1.

Die selektive Entschützung am Lysin erfolgt indem man 1,39 g Cyclo-(Arg(Mtr)-Gly-Asp(OtBu)-D-Tyr(tBu)-Lys(Z)) in 20 ml Dimethylacetamid löst, mit 400 µl HOAc sowie 1 g 5% Pd/Kohle versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre bei leichtem Überdruck 3 Stunden bei Raumtemperatur rührt. Dann wird das Lösemittel entfernt, der Rückstand mit Methanol versetzt, über Kieselgur filtriert und mit Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wird erneut abrotiert, durch Etherzugabe gefällt, filtriert, gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Konjugation mit dem Zuckerbaustein:

100 mg (0,11 mmol) Cyclo-(Arg(Mtr)-Gly-Asp(OtBu)-D-Tyr(tBu)-Lys) werden in 7 ml DMF gelöst und mit 80 mg (0,15 mmol) 3-Acetamido-2,6-anhydro-4,5,7-tri-O-benzyl-3-deoxy-β-D-glycero-D-gulo-heptansäure in 7 ml DMF versetzt. Dann werden 49 mg  $\text{EDCl} \cdot \text{HCl}$  und 39 mg (2eq.) HOBt zugegeben. Die Lösung wird mit N-Ethylmorpholin auf pH 7,5 gebracht und 12 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das DMF abrotiert und der Rückstand mit Wasser versetzt. Der sich bildende Niederschlag abzentrifugiert mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Abspaltung der peptidischen Schutzgruppen:

150 mg c-(Arg(Mtr)-Gly-Asp(OtBu)-D-Tyr(tBu)-Lys(ZAS1(Bn4))) werden mit 10 ml 95% TFA/2,5% Wasser/2,5% Ethandithiol 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird filtriert, das Gemisch abrotiert, mit Ether gefällt, zentrifugiert, gewaschen und im Exsikkator getrocknet.

Abspaltung der Benzyl-Schutzgruppen am Zuckerderivat:

50 mg c-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(ZAS1(Bn4))) werden in 10 ml Wasser/Essigsäure 1 : 1 gelöst, mit 50 mg 5% Pd/Kohle versetzt und unter Wasserstoffatmosphäre erst 15 min am Ultraschallbad behandelt sowie 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der Katalysator wird über Minisart RC 25 Filter (0,45 µm) abgetrennt und in Gegenwart von Toluol

das Lösungsmittel abrotiert. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Rohprodukt wird mittels RP-HPLC gereinigt. Man erhält Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(ZAS)); FAB-MS (M+H): 852.

## Beispiel 3

80 mg Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(ZAS)) werden fünf- bis sechsmal in 0,01 m HCl gelöst und nach jedem Lösungsvorgang gefriergetrocknet. Anschließend Reinigung durch HPLC liefert Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(ZAS)) × HCl.

## Beispiel 4

Zur Herstellung von Affinitätsphasen suspendiert man 0,9 N-Maleinimido-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Polymer [erhältlich durch Kondensation von N-Maleinimido-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-COOH mit H<sub>2</sub>N-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Polymer] in 10 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer bei pH 7 und fügt bei 4° ein Äquivalent Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SH)) hinzu. Man rührt 4 Stunden bei gleichzeitiger Erwärmung der Reaktionsmischung auf Raumtemperatur, filtriert den festen Rückstand ab und wäscht zweimal mit je 10 ml Pufferlösung (pH 7) und anschließend dreimal mit je 10 ml Wasser. Man erhält Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>S-3-(N-maleinimido-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Polymer)).

## Beispiel 5

Analog Beispiel 4 erhält man durch Kondensation von Polymer-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> [im Handel erhältlich] und Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>COOH)) [erhältlich durch Kondensation von Adipinsäure mit Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) unter den genannten Bedingungen] die folgende polymere Phase: Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys-(CO(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-O-Polymer)).

Die nachstehenden Beispiele betreffen pharmazeutische Zubereitungen.

## Beispiel A

## Injektionsgläser

Eine Lösung von 100 g eines Cyclopeptides der Formel I und 5 g Dinatriumhydrogenphosphat in 3 l zweifach destilliertem Wasser wird mit 2 n Salzsäure auf pH 6,5 eingestellt, steril filtriert, in Injektionsgläser abgefüllt, unter sterilen Bedingungen lyophilisiert und steril verschlossen. Jedes Injektionsglas enthält 5 mg Wirkstoff.

## Beispiel B

## Suppositorien

Man schmilzt ein Gemisch von 20 g Wirkstoff der Formel I mit 100 g Sojalecithin und 1400 g Kakaobutter, gießt in Formen und läßt erkalten. Jedes Suppositorium enthält 20 mg Wirkstoff.

## Beispiel C

## Lösung

Man bereitet eine Lösung aus 1 g Wirkstoff der Formel I, 9,38 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 28,48 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 12 H<sub>2</sub>O und 0,1 g Benzalkoniumchlorid in 940 ml zweifach destilliertem Wasser. Man stellt auf pH 6,8 ein, füllt auf 1 l auf und sterilisiert durch Bestrahlung. Diese Lösung kann in Form von Augentropfen verwendet werden.

## Beispiel D

## Salbe

Man mischt 500 mg Wirkstoff der Formel I mit 99,5 g Vaseline unter aseptischen Bedingungen.

## Beispiel E

## Tabletten

Ein Gemisch von 100 g eines Cyclopeptids der Formel I, 1 kg Lactose, 600 g mikrokristalliner Cellulose, 600 g Maisstärke, 100 g Polyvinylpyrrolidon, 80 g Talk und 10 g Magnesiumstearat wird in üblicher Weise zu Tabletten gepreßt, so daß jede Tablette 10 g Wirkstoff enthält.

## Beispiel F

## Dragées

Man preßt Tabletten wie in Beispiel E angegeben und überzieht sie anschließend in üblicher Weise mit einem Überzug aus Saccharose, Maisstärke, Talk, Tragant und Farbstoff.

## Beispiel G

## Kapseln

5 In üblicher Weise werden Hartgelatinekapseln mit einem Wirkstoff der Formel I gefüllt, so daß jede Kapsel 5 mg Wirkstoff enthält.

## Beispiel H

## 10 Inhalationsspray

Man löst 14 g Wirkstoff der Formel I in 10 l isotonischer NaCl-Lösung und füllt die Lösung in handelsübliche Sprüh-  
gefäße mit Pump-Mechanismus. Die Lösung kann in Mund oder Nase gesprüht werden. Ein Sprühstoß (etwa 0,1 ml) ent-  
spricht einer Dosis von etwa 0,14 mg.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Merck Patent GmbH
- (B) STRASSE: Frankfurter Strasse
- (C) ORT: Darmstadt
- (D) BUNDESLAND: Hessen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 64271
- (G) TELEFON: 0049/6151 72 2683
- (H) TELEFAX: 0049/61651 727191

5

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Cyclische Adhaesionsinhibitoren und deren Verwendung fuer bildgebende Verfahren

15

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

20

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

25

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

30

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

35

(iv) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

## (ix) MERKMAL:

40

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
- (B) LAGE:1
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Arg(Mtr)"  
/label= Mtr  
/note= "Mtr wie definiert; N-Terminus"

45

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
- (B) LAGE:3
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Asp(OBut)"  
/label= OBut  
/note= "OBut wie definiert"

50

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site
- (B) LAGE:4
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "Tyr(3-I)"  
/label= 3-I  
/note= "3-I wie definiert"

55

60

65

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
 (B) LÄGE: 5  
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Val-ONa"  
                               /label= O-Na  
                               /note= "C-Terminus; Natriumsalz"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Arg Gly Asp Tyr Val  
 1                              5

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM:  
 (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Modified-site  
 (B) LÄGE: 4  
 (D) SONSTIGE ANGABEN: /product= "Tyr(3-I)"  
                               /label= 3-I  
                               /note= "Iodsubstitution in meta-Stellung"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Arg Gly Asp Tyr Val  
 1                              5

## Patentansprüche

## 1. Cyclopeptide der Formel I

Cyclo-(Arg-Gly-Asp-D-E) I,

worin

D und E jeweils unabhängig voneinander Gly, Ala,  $\beta$ -Ala, Asn, Asp, Asp(OA), Arg, Cha, Cys, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Lys(Ac), Lys(AcNH<sub>2</sub>), Lys(AcSH), Lys(R), Met, Nal, Nle, Orn, Phe, Phe(4-OA) Phe(4-Hal), Homo-Phe, Phg, Pro, Pya, Ser, Thr, Tia, Tic, Trp, Tyr, Tyr(3-D), Tyr(3-F) oder Val, wobei die genannten Aminosäurereste auch derivatisiert sein können,

A Alkyl mit 1-18 C-Atomen,

Hal F, Cl, Br, I,

Ac Alkanoyl mit 1-10 C-Atomen, Aroyl mit 7-11 C-Atomen oder Aralkanoyl mit 8-12 C-Atomen, wobei die Reste auch partiell fluoriert sein können,

R einen Komplexbildner für radioaktive Isotope wie HS(Me)Ac-Gly-Gly-gAbu-OH für Tc-99m oder Tc(O)-bis-(mercaptoacetamido)-pentansäure, Re(O)-Mercaptoethylthioacetyl-Cys, eine Zuckercarbonsäure oder Ac bedeuten,

mit der Maßgabe, daß die Verbindungen auch am N-Atom der Peptidbindung alkyliert und/oder an beliebigen Positionen durch 125-I, 123-I, 3-H, 11-C, 14-C, 18-F, 15-O oder andere radioaktive Isotope markiert sein können,

und wobei, sofern es sich um Reste optisch aktiver Aminosäuren und Aminosäurederivate handelt, sowohl die D- als auch die L-Formen eingeschlossen sind, sowie deren physiologisch unbedenkliche Salze innere Salze und Solvate.

2. Ein Enantiomer oder ein Diastereomer einer Verbindung der Formel gemäß Anspruch 1.

3.

- (a) Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DTyr(3-I)-Val);
- (b) Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys);
- (c) Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys(ZAS));
- (d) Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys(ZAS));
- (e) Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Tyr(3-II));
- (f) Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys(CO-(4-F-phenyl)));
- (g) Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys(Re(O)-mercaptoethylthio-Cys));
- (h) Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-Tyr(3-I, OP(O-phenyl)<sub>2</sub>));
- (i) Cyclo-(Arg-Gly-Asp-DTyr(3-I, OP(O-phenyl)<sub>2</sub>)-Val)

gemäß Anspruch 1 sowie deren physiologisch unbedenklichen Salze.

4. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel I nach Anspruch 1 oder eines ihrer Salze, dadurch gekennzeichnet, daß man sie aus einem ihrer funktionellen Derivate durch Behandeln mit einem solvolysierenden oder hydrogenolysierenden Mittel in Freiheit setzt oder daß man ein Peptid der Formel II

H-Z-OH II,

worin

Z -Arg-Gly-Asp-D-E-

-Gly-Asp-D-E-Arg-

-Asp-D-E-Arg-Gly-

-D-E-Arg-Gly-Asp- oder

-E-Arg-Gly-Asp-D- bedeutet,

oder ein reaktionsfähiges Derivat eines solches Peptids mit einem cyclisierenden Mittel behandelt,

oder daß man ein Cyclopeptid, welches an sich der Formel I entspricht, aber über eine oder mehrere freie Aminogruppen, Säuregruppen und/oder aktivierte  $\alpha$ -C-Atome verfügt, durch Alkylierung, Acylierung oder Veresterung derivatisiert,

und/oder daß man eine basische oder saure Verbindung der Formel durch Behandeln mit einer Säure oder Base in eines ihrer Salze überführt.

5. Verfahren zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Verbindung der Formel I nach Anspruch 1 und/oder eines ihrer physiologisch unbedenklichen Salze zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff in eine geeignete Dosierungsform bringt.

6. Pharmazeutische Zubereitung, gekennzeichnet durch einen Gehalt an mindestens einer Verbindung der allgemeinen Formel I nach Anspruch 1 und/oder einem ihrer physiologisch unbedenklichen Salze.

7. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 oder von deren physiologisch unbedenklichen Salzen zur Herstellung einer Zubereitung für bildgebende Untersuchungsmethoden. (Tumor-Imaging).

8. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 oder von deren physiologisch unbedenklichen Salzen zur Herstellung einer Zubereitung zum Tumor-Imaging.

9. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 oder von deren physiologisch unbedenklichen Salzen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Bekämpfung von Krankheiten.

10. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 oder deren physiologisch unbedenklichen Salzen bei der Bekämpfung von Krankheiten.

11. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 zur Herstellung von immobilisierten Liganden für Affinitätsäulenchromatographie.

12. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 zur Reinigung von Integrinen durch Affinitätschromatographie.

- Leerseite -

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

### **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

### **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**